

課題番号	Q18L-02
課題名（和文）	アポトーシスにおいて DNA 損傷をミトコンドリアに伝える新しいシグナル伝達経路の探索
課題名（英文）	Survey for novel signaling proteins mediating DNA damage to mitochondria using 2D electrophoresis
研究代表者	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 理工学部生命科学系 特任教授 氏名 刀祢 重信
共同研究者	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 理工学部生命科学系 大学院 2 年 氏名 清水 諒
	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 理工学部生命科学系 大学院 2 年 氏名 神山 遥
	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 理工学部生命科学系 大学院 2 年 氏名 中野将太郎

研究成果の概要（和文）

ニワトリ白血球細胞株 DT40 の野生型株から単離した核を UV 照射し、その遠心上清をミトコンドリアに反応させると、チトクロム c の漏出が確認された。このことは、UV 照射した核からミトコンドリアに何らかのシグナルが遊離されていることを示唆する。そこで野生型株と DNA-PK 蛋白欠損ミュータント細胞株で 2 次元電気泳動法によって存在するタンパク質を比較すると明らかに異なるスポットが検出できた。質量分析によって、あるガン関連のタンパク質であることが判明した。

研究成果の概要（英文）

We have previously found that upon UV irradiation, unidentified factor(s) were released from nuclei, moved to mitochondria, triggered caspase activation and apoptosis using DT40 chicken lymphoma cells.

In this study, we found that isolated nuclei from wild type DT40 cells could release factor(s) activating mitochondria membrane potential and cell death. It is tempting to speculate that this factor would be a novel intrinsic death factor other than p53, because apoptosis of DT40 by UV is independent on p53 pathway. This factor would be associated with DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), because DT40 mutant deficient for DNA-PK gene could not die by UV. Finally, we identified a candidate for one of these factors using 2-D gel electrophoresis and TOF MS/MS. Interestingly, this tumor related protein has at least three phosphorylatable Ser/Thr residues.

1. 研究開始当初の背景

細胞は、核 DNA が傷害を受けたことをどのようにしてミトコンドリアに伝えるのか？これは、アポトーシスの最も早期の細胞のレスポンスである。これまで p53 蛋白が中心的な役割を果たしていると考えられてきたが、p53 が機能しない細胞も多く、p53 以外の第 2 のシステムを細胞は用意していると考えられる。

DNA 修復に関わる 7 つの系の 13 個の蛋白質の遺伝子をノックアウトし、DNA 修復に異常をきたすことが予想される DT40 細胞のミュータント株がアポトーシスしやすくなることを確かめる実験を行ったところ、想定外の結果が得られた。DNA 修復に異常をきたし、死にやすくなるどころか逆に死ねなくなったのである。

2. 研究の目的

上述の予想外な結果から、その細胞生物学的な意味を独自に考察し、新たなアポトーシス伝達機構の可能性を考えるに至った。本研究の目的は、p53 に依存しない未知のシグナル伝達経路を明らかにすることである。

3. 研究の方法

ニワトリ白血病細胞株 DT40 の野生型株から単離した核に、紫外線照射した後にその遠心上清を取得する。その上清をそれぞれ単離したミトコンドリアにかけ、37℃で反応させ、30分後にその上清中に存在する、ミトコンドリアから漏れてきたチトクロム c をウェスタンブロッティングで解析する。

もし、ある時間以降に核からミトコンドリアに「死のメッセージ」が発信されていることが確認できたならば、次に DNA-PK 蛋白を欠損したミュータント細胞株から核を単離し、同様の実験を行う。もし、ミュータント細胞株からの単離核では「死のメッセージ」が発信されていなかったならば、DNA-PK が核内で「死のメッセージ」をリン酸化していると考えられる。

野生型及び DNA-PK 欠損ミュータント細胞株両者の上清を 2 次元電気泳動にかけ、変化するスポットを網羅的に検索する。それらのスポットを切り出し、質量分析計で蛋白を同定する。

次にその「死のメッセージ」の候補の蛋白質の中で、リン酸化される可能性が高い配列を検索し、リン酸化されるセリン/スレオニン残基をアラニンなど別のアミノ酸に変換し、リン酸化されないように塩基置換した変異遺伝子を細胞に

強制発現し、アポトーシスが起きるか否かを調べる。このために浮遊系細胞でも効率よく遺伝子が導入できるエレクトロポレーターを新たに導入し、内在性遺伝子をゲノム編集法で、リン酸化されない配列に置換し、その効果を検証する。

4. 研究成果

ニワトリ白血病細胞株 DT40 の野生型株から単離した核に、紫外線照射した後にその遠心上清を取得した。その上清を単離したミトコンドリアにかけ、37℃で反応させると、ミトコンドリアからチトクロム c の漏出が確認された。このことは、紫外線照射した核からミトコンドリアに何らかのシグナルが遊離されていることを示唆する。

そこで野生型株と DNA-PK 蛋白を欠損したミュータント細胞株で 2 次元電気泳動法によって存在するタンパク質を比較すると明らかに異なる 1 つのスポットが検出できた。そこでこのスポットを LC MS/MS で質量分析すると、あるガン関連のタンパク質であることが判明した。このタンパク質には 3 カ所のリン酸化されるセリン/スレオニン残基が存在する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、共同研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

①Shinohara K, Ito A, Ohigashi T, Kado M, Toné S. Discrimination of DNA and RNA distribution in a mammalian cell by scanning transmission soft X-ray microscopy. **J Xray Sci Technol.** 査読有 26(6):877-884 (2018)

②Shinohara K, Toné S, et al. Quantitative Distribution of DNA, RNA, Histone and Proteins Other than Histone in Mammalian Cells, Nuclei and a Chromosome at High Resolution Observed by Scanning Transmission Soft X-Ray Microscopy **Cells.** 査読有 8,164; doi:10.3390/cells8020164 (2019)

③Nakaya G, Sakagami H, Koga-Ogawa Y, Shiroto A, Nobesawa T, Ueda D, Nakatani S, Kobata K, Iijima Y, Toné S, et al. Augmentation of Neurotoxicity of Anticancer Drugs by X-Ray Irradiation **In Vivo** 査読有 *in press* (2020)

[学会発表] (計 9 件)

① American Society for Cell Biology
Role of ATG5 in apoptotic nuclear disassembly
Shimizu R, Toné S 2019 年 12 月 10 日
米国 Washington DC

② 日本 Cell Death 学会 β アクチン C 末端側 15kDa 断片による細胞死誘導経路の探索 神山 遥, 伊東奈那子, 鍛冶学, 田中真人, 刀祢重信
2019 年 7 月 12 日 東京